

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590829

研究課題名（和文） 肝臓、膵臓におけるアンドロゲンレセプターシグナリングの解析

研究課題名（英文） Androgen receptor signaling in liver and pancreatic cancer

研究代表者

神田 達郎（KANDA TATSUO）

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：20345002

研究成果の概要（和文）：1) 膵臓細胞においてインターロイキン 6 (IL6)により Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)を介したアンドロゲンレセプターシグナル伝達経路の活性化が認められた。膵臓において IL6 はアンドロゲンレセプター活性化を介して発癌進展に関与している可能性が示唆された。2) B 型肝炎ウイルス増殖および B 型肝炎の肝発癌進展にアンドロゲンレセプターおよびヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が深く関与していることが明らかとなった。これらの阻害剤は B 型肝炎の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：1) Interleukin-6 acts a positive regulator in androgen receptor signaling in pancreatic cancer cell lines, suggesting that interleukin-6 and androgen receptor signaling might play important roles in the progression of pancreatic carcinogenesis. 2) Hepatitis B virus affects nuclear receptors and their related signal transduction. They also might be involved in replication of hepatitis B virus and hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦においては C 型肝炎ウイルス (HCV)および B 型肝炎ウイルス(HBV)感染による慢性肝炎、肝硬変から肝細胞癌が高頻度に発症する。肝細胞癌はこれら原因に限らずその発症頻度に 2:1～4:1 で男性優位という性

差が存在する。

(2)膵臓罹患数および死亡数は著しく増加している。ほぼ全年齢層において男性の罹患数者が女性を上回っている。2cm 以内の通常型膵臓の性別でも男性患者数が優位であり、進行度にかかわらず男性に患者数が多い。

(3) アンドロジェンレセプター(AR)は核内レセプターに属するリガンド依存性の転写因子であり、AR の転写活性化機能は男性の正常な性発達のみならず癌の進展に関わっていることが示されている。アンドロジェンがAR のリガンド結合ドメイン(LBD)に結合するとAR に構造的変化が生じ、AR が細胞質から核内へ移動する、そして、AR はホモダイマーを形成しアンドロジェンレセプターエレメント(ARE)に結合活性化する。ARE は vascular endothelial growth factor (VEGF) や transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) のような標的遺伝子の制御因子内に存在し、細胞発育や増殖を制御すると報告されている。

(4)われわれは HCV コア蛋白がアンドロジェンの存在下で AR シグナリングを活性化することを見出し、HCV コア蛋白が AR シグナリングと相互作用し肝発癌進展に関与することを報告している(Kanda et al., J. Virol., 2008)。

## 2. 研究の目的

(1)AR シグナリングにはアンドロジェンをリガンドとするアンドロジェン依存性経路および非依存性経路が知られている。後者には Jak/STAT3, mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositide 3 kinase (PI3K)/Akt pathway などが含まれている。Jak/STAT3 および MAPK pathway の上流は IL6 レセプター(IL6R) である。膵癌においてAR の活性化にどのアンドロジェン非依存性経路の活性化が関わっているかを明らかにする。

(2)本研究では、従来から知られているAR 活性化経路を検索することにより進行肝細胞癌および進行膵臓癌に対する分子標的療法の標的候補を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1)AR の発現の比較的少ない膵癌細胞株

MIAPaCa-2 ほか、Panc-1、AsPc-1、SUIT-2、KP-2 を用いた。AR のリガンドとして Dihydrotestosterone (DHT)を用いた。(2) IL6R、AR の発現を Western blotting, Real-time RT-PCR を用いて検討した。

(3)Dihydrotestosterone (DHT)およびIL6投与群と非投与群に分けて、STAT3, p42-/p44-MAPK, AR のリン酸化をそれぞれ検討した。(4)DHT および IL6 の存在および非存在下に AR 発現ベクターpSG5-AR および ARE を含むレポーターベクターpARE4-Luc を共に細胞内遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにて AR の活性化を検討した。(5)MAPK および Jak-STAT3 の特異的阻害剤としてそれぞれ U0126 および AG490 を用いた。STAT3 および AR は siRNA にて Knock-down した。(6)各 mRNA および蛋白発現の検討は Real-time RT-PCR および Western blot を用いた。

(7)Wound-Healing-Scratching Assay を用いて細胞浸潤能を評価した。(8) B 型肝炎のモデルとして HBV 感染粒子を産生する HepG2.2.15 細胞を使用した。(9)HepG2.2.15 および親細胞 HepG2 におけるアンドロジェンレセプターシグナル伝達経路をはじめとする核内レセプターシグナル伝達経路関連分子を Real-time RT-PCR array を用いて網羅的に解析した。(10)更に機能解析を行なうことにより HBV 増殖、肝発癌に関与するシグナル伝達経路を検討した。

## 4. 研究成果

(1)膵癌細胞株では様々なレベルで AR および IL6R、Grp130 の発現が認められた。(2)各種阻害剤を用いた検討より Jak/STAT3, MAPK シグナルの AR 活性化への関与がみられた。(3)DHT の存在下で IL6 により 705Tyr-STAT3 のリン酸化および ERK のリン酸化が増強し、AR の活性化も増強した。(4)IL6 の投与によりこれらシグナルの増強がみられた。(5)DHT

と IL6 併用では AR の活性化が増強した。(6) 更に AR および IL6R を発現している KP-2 細胞では DHT および IL6 の存在下で浸潤能の亢進が認められた。本研究により膀胱癌細胞にて IL6 により STAT3 を介した AR シグナル伝達経路の活性化が認められた。膀胱癌において IL6 は AR 活性化を介して発癌進展に関与している可能性が明らかになった。(7) HepG2 と比較し HepG2.2.15 では核内レセプター関連 84 遺伝子中 40 遺伝子(47.6%)の発現が mRNA レベルで 2 倍以上亢進していた。(8) HepG2.2.15 では アンドロジェンレセプターシグナル伝達経路関連遺伝子のうち NR1H3、THRAP5、MED4、CRSP6、THRAP4、THRAP1、PPARBP の 7 遺伝子の mRNA レベルが有意に上昇し、この経路の重要性が示唆された。(9) Negative regulators of transcription の中には ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)6、HDAC4、HDAC5、Other transcriptional factors の中には B 型肝炎への関与が報告されている HDAC2 の上昇を認めた。(10) 特にアンドロジェンレセプターおよび HDAC に注目し、アンドロジェンレセプターの siRNA および HDAC 阻害剤である Trichostatin A を併用することにより強力に B 型肝炎細胞の増殖抑制が得られることを明らかにした。以上の事から HBV 増殖および B 型肝炎の肝発癌進展にアンドロジェンレセプターおよび HDAC が深く関与していることが明らかとなった。これらの阻害剤は B 型肝炎の治療に有用である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① S. Wu, T. Kanda, F. Imazeki, S. Nakamoto, H. Shirasawa, O. Yokosuka: Nuclear receptor mRNA expression by HBV in

human hepatoblastoma cell lines. *Cancer Lett* 312:33-42, 2011. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.025>

- ② T. Miyamura, T. Kanda, S. Nakamoto, S. Wu, K. Fujiwara, F. Imazeki, O. Yokosuka: Hepatic STAT1-Nuclear Translocation and Interleukin 28B Polymorphisms Predict Treatment Outcomes in Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS ONE* 6(12):e28617, 2011. (査読有)  
 DOI:10.1371/journal.pone.0028617
- ③ R. Tamura, T. Kanda, F. Imazeki, S. Wu, S. Nakamoto, T. Tanaka, M. Arai, K. Fujiwara, K. Saito, T. Roger, T. Wakita, H. Shirasawa, O. Yokosuka: HCV NS5A Protein Inhibits Lipopolysaccharide-Mediated Apoptosis of Hepatocytes by Decreasing Toll-Like Receptor 4 Expression. *J Infect Dis.* 204(5):793-801, 2011. (査読有) DOI: 10.1093/infdis/jir381
- ④ K. Okitsu, T. Kanda, F. Imazeki, Y. Yonemitsu, R.B. Ray, C. Chang, O. Yokosuka: Involvement of interleukin-6 and androgen receptor signaling in pancreatic cancer. *Genes & Cancer* 1:859-867, 2010. (査読有) DOI: 10.1177/1947601910383417
- ⑤ T. Kanda, V. Gauss-Muller, S. Cordes, R. Tamura, K. Okitsu, W. Shuang, S. Nakamoto, K. Fujiwara, F. Imazeki, O. Yokosuka: Hepatitis A (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J. Viral. Hepat.* 17:618-23, 2010. (査読有) DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01221.x
- ⑥ S. Wu, T. Kanda, F. Imazeki, M. Arai, Y.

- Yonemitsu, S. Nakamoto, K. Fujiwara, K. Fukai, F. Nomura, O. Yokosuka: Hepatitis B virus e antigen down-regulates cytokine production in human hepatoma cell lines. *Viral Immunol.* 23:467-476, 2010. (査読有) DOI:10.1089/vim.2010.0042.
- ⑦ T. Kanda, F. Imazeki, O. Yokosuka. New antiviral therapies for chronic hepatitis C. *Hepatol Int.* 4:548-561, 2010. (査読有) DOI: 10.1007/s12072-010-9193-3
- ⑧ L. Yang, T. Kiyohara, T. Kanda, F. Imazeki, K. Fujiwara, V. Gauss-Muller, K. Ishii, T. Wakita, O. Yokosuka: Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology* 7:212, 2010. (査読有) DOI:10.1186/1743-422X-7-212
- ⑨ S. Nakamoto, T. Kanda, Y. Yonemitsu, M. Arai, K. Fujiwara, K. Fukai, F. Kanai, F. Imazeki, O. Yokosuka: Quantification of hepatitis C amino acid substitutions 70 and 91 in core coding region by real-time amplification refractory mutation system reverse transcription-polymerase chain reaction. *Scand. J. Gastroenterol.* 44: 872-877, 2009. (査読有) DOI:10.1080/00365520902937362
- ⑩ S. Nakamoto, F. Imazeki, K. Fukai, M. Arai, K. Fujiwara, M. Arai, T. Kanda, Y. Yonemitsu, O. Yokosuka: Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J. Hepatol.* 52: 72-78, 2009. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.001>
- ① S. Wu, T. Kanda, F. Imazeki, S. Nakamoto, A. Tawada, M. Arai, K. Fujiwara, O. Yokosuka. Alterations of nuclear receptors and related genes expression by HBV in human hepatoma cell lines. 21th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 2011.2.17-20.
- ② 膵癌における IL-6, STAT3, androgen receptor シグナル伝達経路に関する検討 神田達郎、沖津恒一郎、呉霜、中本晋吾、太和田暁之、今関文夫、横須賀収 第18回浜名湖シンポジウム アクトシティ浜松 コンgressセンター (浜松)、2010.12.25.
- ③ T. Kanda, R. Tamura, F. Imazeki, S. Nakamoto, S. Wu, R. Thierry, T. Wakita, H. Shirasawa, O. Yokosuka. Hepatitis C virus NS5A attenuates LPS-induced apoptosis by downregulation of toll-like receptor 4 signaling pathway. HCV2010 17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Pacific Yokohama, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- ④ 肝細胞癌における Androgen receptor の発現～ポリコム遺伝子との関連について～ 米満裕、今関文夫、神田達郎、沖津恒一郎、千葉哲博、新井誠人、藤原慶一、横須賀収 第46回日本肝臓学会総会 (山形)、P-126, 2010.5.27.
- ⑤ HCV NS5A は LPS-TLR4 経路を介する Apoptosis を阻害する 田村玲、神田達郎、今関文夫、米満裕、沖津恒一郎、中本晋吾、新井誠人、藤原慶一、横須賀収 第96回日本消化器病学会総会 (新潟)、2010.4.23.
- ⑥ 膵臓癌における IL-6/STAT3/MAPK/AR シ

- グナル活性と腫瘍進展効果の検討 沖津恒一郎、神田達郎、今関文夫、米満裕、Chang C、横須賀收 第96回日本消化器病学会総会（新潟）、2010.4.22.
- ⑦ R. Tamura, T. Kanda, Y. Yonemitsu, K. Okitsu, S. Nakamoto, M. Arai, K. Fujiwara, F. Imazeki, O. Yokosuka. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A downregulates toll-like receptor-4 signaling and blocks LPS-induced apoptosis in hepatoma cell lines. 20th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. China National Convention Center, Beijing, China, 2010.3.25-28. (口演)
- ⑧ T. Kanda. Interaction of hepatitis C virus core and androgen signaling in hepatocarcinogenesis. Asian Hepatitis Forum 2009. The Grand Hotel, Taipei, Taiwan, 2009.12.13. (口演)
- ⑨ 膵臓癌における IL-6 による Androgen レセプターシグナル活性化の検討 沖津恒一郎、神田達郎、米満裕、今関文夫、Chawnshang Chang、横須賀收 第51回日本消化器病学会大会（京都）、2009.10.16.
- ⑩ K. Okitsu, T. Kanda, F. Imazeki, C. Chang, O. Yokosuka. Interleukin-6 activates androgen receptor signaling in pancreatic cancer. Asian Pacific Digestive Week 2009. Taipei International Convention Center (TICC), Taipei, Taiwan, 2009.9.27-30. (口演)
- ⑪ C型肝炎ウイルスによる肝発癌における Androgen receptor (AR) シグナリングの関与 横須賀收、神田達郎 犬山シンポジウム（犬山）、2009.8.6.
- ⑫ 膵臓癌における男性ホルモン androgen receptor (AR)関連シグナルの関与について 沖津恒一郎、神田達郎、米満裕、新井誠人、深井健一、金井文彦、今関文夫、横須賀收 第5回消化器病における性差医学・医療研究会（日本消化器病学会関連研究会）（大阪）、2009.7.25.
- ⑬ HCV core 蛋白による androgen receptor を介したシグナル伝達の増強について 神田達郎、今関文夫、米満裕、沖津恒一郎、中本晋吾、田村玲、藤原慶一、呉霜、新井誠人、藤原慶一、深井健一、金井文彦、横須賀收、Robert Steele、Ranjit Ray、Ratna Ray 第45回日本肝臓学会総会（神戸）、2009.6.5.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

神田 達郎 (KANDA TATSUO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：20345002